

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 24020051302543

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

纳米金对聚合酶链式反应的影响及其机制
研究

The Effect of Gold Nanoparticles on Polymerase Chain
Reaction and The Mechanism Research

李 辉

指导教师姓名: 张其清 教授/博士生导师

孙莉萍 助理教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2008.07

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2008 年 7 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

| | |
|----------------------|----|
| 中文摘要 | I |
| 英文摘要 | I |
| 第一章 绪论 | 1 |
| 1.1 PCR技术简介 | 1 |
| 1.1.1 PCR技术存在的问题 | 2 |
| 1.1.2 PCR常用优化方法 | 3 |
| 1.1.3 PCR各组分对PCR的影响 | 3 |
| 1.1.4 反应条件对PCR的影响 | 5 |
| 1.2 纳米金的背景知识介绍 | 7 |
| 1.2.1 纳米金的特性 | 7 |
| 1.2.2 纳米金的制备 | 8 |
| 1.2.3 纳米金的表征 | 8 |
| 1.2.4 纳米金在生物医学领域的应用 | 8 |
| 1.3 纳米金对PCR的影响 | 9 |
| 1.4 本课题的提出 | 12 |
| 第二章 纳米金对PCR的影响及其机制探讨 | 13 |
| 2.1 纳米金的制备与表征 | 13 |
| 2.1.1 实验材料 | 13 |
| 2.1.2 实验方法 | 14 |
| 2.1.3 结果与讨论 | 14 |
| 2.2 HeLa细胞的培养 | 18 |
| 2.2.1 实验材料 | 18 |
| 2.2.2 实验方法 | 19 |
| 2.2.3 结果与讨论 | 20 |
| 2.3 细胞基因组DNA的提取与分析 | 23 |

| | | |
|----------|-----------------|----|
| 2.3.1 | 实验材料 | 23 |
| 2.3.2 | 实验方法 | 24 |
| 2.3.3 | 结果与讨论 | 24 |
| 2.4 | 基于纳米金的PCR及其机制研究 | 27 |
| 2.4.1 | 实验材料 | 27 |
| 2.4.2 | 实验方法 | 28 |
| 2.4.3 | 结果与讨论 | 29 |
| 第三章 | 全文总结 | 45 |
| 参考文献 | | 47 |
| 硕士期间研究成果 | | 57 |
| 致 谢 | | 59 |

Contents

| | |
|---|----|
| Abstract in Chinese | I |
| Abstract in English | I |
| Chapter 1 Preface | 1 |
| 1.1 PCR | 1 |
| 1.1.1 Deficiency of PCR..... | 2 |
| 1.1.2 Optimize methods for PCR | 3 |
| 1.1.3 The effect of PCR reagents on PCR..... | 3 |
| 1.1.4 The effect of PCR run conditions on PCR | 5 |
| 1.2 Gold nanoparticles | 7 |
| 1.2.1 Properties of gold nanoparticles..... | 7 |
| 1.2.2 Preparation of gold nanoparticles | 8 |
| 1.2.3 Characterization of gold nanoparticles | 8 |
| 1.2.4 Applications of gold nanoparticles in Biomedicine..... | 8 |
| 1.3 The effect of gold nanoparticles on PCR | 9 |
| 1.4 Aims of this research | 12 |
| Chapeter 2 The effect of gold nanoparticles and possible mechanism | 13 |
| 2.1 Preparation and Characterization of gold nanoparticles | 13 |
| 2.1.1 Materiales and reagents..... | 13 |
| 2.1.2 Methods..... | 14 |
| 2.1.3 Results and discussion..... | 14 |
| 2.2 Hela Cell culture | 18 |
| 2.2.1 Materiales and reagents..... | 18 |
| 2.2.2 Methods..... | 19 |
| 2.2.3 Results and discussion..... | 20 |
| 2.3 Extraction and analysis of HeLa cell DNA | 23 |
| 2.3.1 Materiales and reagents..... | 23 |
| 2.3.2 Methods..... | 24 |
| 2.3.3 Results and discussion..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4 The effect of gold nanoparticles and the mechanism | 27 |
| 2.4.1 Materiales and reagents | 27 |
| 2.4.2 Methods | 28 |
| 2.4.3 Results and discussion | 29 |
| Chapeter 3 Conclusions | 45 |
| References | 47 |
| Research achievements | 57 |
| Acknowledgements | 59 |

摘 要

聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 是生物医学领域最常用、最重要的技术之一, 它能够实现 DNA 片段的体外扩增, 可以满足后续的分析测试需要, 因此是许多临床检测和生物分析的基础。纳米技术的发展以及与生物技术的融合, 为解决生物技术中的问题提供了机遇, 纳米物质对于 PCR 反应的影响也日益受到人们的关注。本论文研究了纳米金对 PCR 反应的影响, 并对其影响 PCR 反应的机制进行了探讨。实验结果表明:

1. 往 PCR 体系中加入一定量的纳米金 (0~1.2 nM) 之后, PCR 反应被抑制, 并且这种抑制作用与纳米金的浓度有关, 纳米金的浓度越大, PCR 反应产物的产量就越少, 当纳米金浓度大于 1.0 nM 时 PCR 反应甚至被完全抑制, 得不到扩增产物。

2. 提高 Taq DNA 聚合酶的浓度至初始浓度的 1.6 倍, 即可有效地解除纳米金对 PCR 反应的抑制, 而分别提高 PCR 体系其他组分 (Mg^{2+} 、dNTP、引物、模板等) 的浓度至初始浓度的 6 倍, 仍无效。

3. 提高 Taq DNA 聚合酶的浓度可以有效解除纳米金对 PCR 反应的抑制, 再次提高纳米金的浓度, PCR 反应又被抑制, 如果再次提高 Taq DNA 聚合酶的浓度又可以解除抑制。说明纳米金与 Taq DNA 聚合酶的相互作用是导致 PCR 抑制的主要原因。

4. 在含有 1.0 nM 纳米金的 PCR 体系中, 保持 Taq DNA 聚合酶的浓度 (1.25 U/ μ L) 不变, 添加牛血清蛋白 (BSA), 当其浓度大于 0.04 μ g/ μ L 时也可以解除纳米金对 PCR 反应的抑制说明, BSA 和 Taq DNA 聚合酶可以竞争性地与纳米金相互作用。

5. 纳米金与 Taq DNA 聚合酶混合体系的紫外可见吸收光谱结果显示: 纳米金的吸收峰由 518 nm 红移到 527 nm, 并且吸收峰变宽; 粒径分析结果显示, 粒径变大; X 射线光电子能谱图上出现了 Au 和 N 的吸收峰。这些结果均证明, 纳米金与 Taq DNA 聚合酶和 BSA 之间存在相互作用。

6. 圆二色谱结果表明, 纳米金与 BSA 相互作用后 BSA 的 α -螺旋含量由 63.1% 降低为 47.7 % 说明, BSA 的构象发生了改变, 并且纳米金的浓度越高, BSA 的构象改变就越大。

7. 提出了纳米金抑制 PCR 扩增的机制: 纳米金与 Taq DNA 聚合酶相互作用后导致其构象发生了改变, 降低了酶的活性, 导致 PCR 的扩增效率降低。

关键词: 纳米金; 聚合酶链式反应; 相互作用

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Polymerase Chain Reaction (PCR) is one of the most popular and important technologies in biology and medicine. DNA molecules can be amplified by this technique, and can be used for further analysis. With the development of nanotechnology and it combines with biological techniques, it meet with a chance for ravel out some inconveniences in biological techniques. In this paper, we study the effect of gold nanoparticles on the polymerase chain reaction (PCR) and investigate its mechanism. The results suggest that:

1. Gold nanoparticles tend to inhibit the PCR, and the inhibition depend on the amount of gold nanoparticles. The more the amount of gold nanoparticles was used, the little the amplification yields were harvested.

2. Increasing Taq DNA polymerase can eliminate the inhibitory effect of PCR, while increasing any other PCR ingredients (Mg^{2+} , dNTP, primer, DNA template) can not work.

3. Although the inhibitory effect can be reversed by increasing Taq DNA polymerase, the PCR is suppressed again by addition of more gold nanoparticles. When increasing Taq DNA polymerase, the inhibitory effect can be removed once again. Thus the inhibitory effect is caused by the interaction between gold nanoparticles and Taq DNA polymerase.

4. The inhibitory effect can be reversed by adding bovine serum albumin (BSA). It indicates that BSA and Taq DNA polymerase interact with gold nanoparticles competitively.

5. The results of UV-vis spectrum, distributing spectra respectively shows that the absorption spectrum shifts from 518nm to 527nm, the gold nanoparticles become larger, and X-ray photoelectronic spectrum (XPS) appears Au and N peak, those indicated that both BSA and Taq DNA polymerase interacted with gold nanoparticles.

6. The circular dichroism (CD) data shows that the conformation of BSA is changed after conjugation, and the conformation change is bigger at higher concentrations of gold nanoparticles.

7. We propose the possible mechanism that gold nanoparticles effect PCR: the conformation of Taq DNA polymerase could be changed by gold nanoparticles, the activity of polymerase may be decreased, leading to suppression of PCR.

Key words: gold nanoparticles; polymerase chain reaction; PCR; interaction

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 绪论

1.1 PCR 技术简介

聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）是 20 世纪 80 年代发展起来的一种体外核苷酸扩增技术^[1-5]。1985 年 Mullis K B^[1]等首先建立了 PCR 方法并成功体外扩增了 DNA 序列，但是他们使用的大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 不能耐受使 DNA 变性的高温，所以每一轮反应都需添加新的酶，产量不高且操作繁复，使得这种实验方法难于推广。1988 年 Saiki R K^[4]等将一种热稳定的 DNA 聚合酶（Taq 酶）引入到 PCR 体系，大大提高了 PCR 的扩增效率，并且使 PCR 方法易于自动化进行。到了 1980 年末，PCR 已经成为遗传与分子生物分析的根本基石。由于 PCR 技术可以简易、快速、高效的扩增出目的 DNA 片段，为 DNA 测序和其他分子生物学研究带来了前所未有的希望和曙光，因此它被广泛的使用并且得以迅速的发展，至今已成为生物医学领域最常用、最重要的技术之一。

虽然 PCR 技术可以快速特异的在体外扩增目的 DNA 片段，但是其工作原理^[6]（见图 1-1）并不复杂，主要包括：1）变性（90~95 °C） 双链 DNA 模板在热作用下，氢键断裂，形成单链 DNA 模板；2）退火（40~65 °C） 系统温度降低，引物与 DNA 模板结合形成局部双链；3）延伸（70~75 °C） 在 Taq DNA 聚合酶（在 72 °C 左右具有最佳活性）的作用下以 dNTP 为原料，靶序列为模板，按照碱基互补配对的原则，从引物的 5' 端向 3' 端延伸，合成一条与模板互补的 DNA 链。

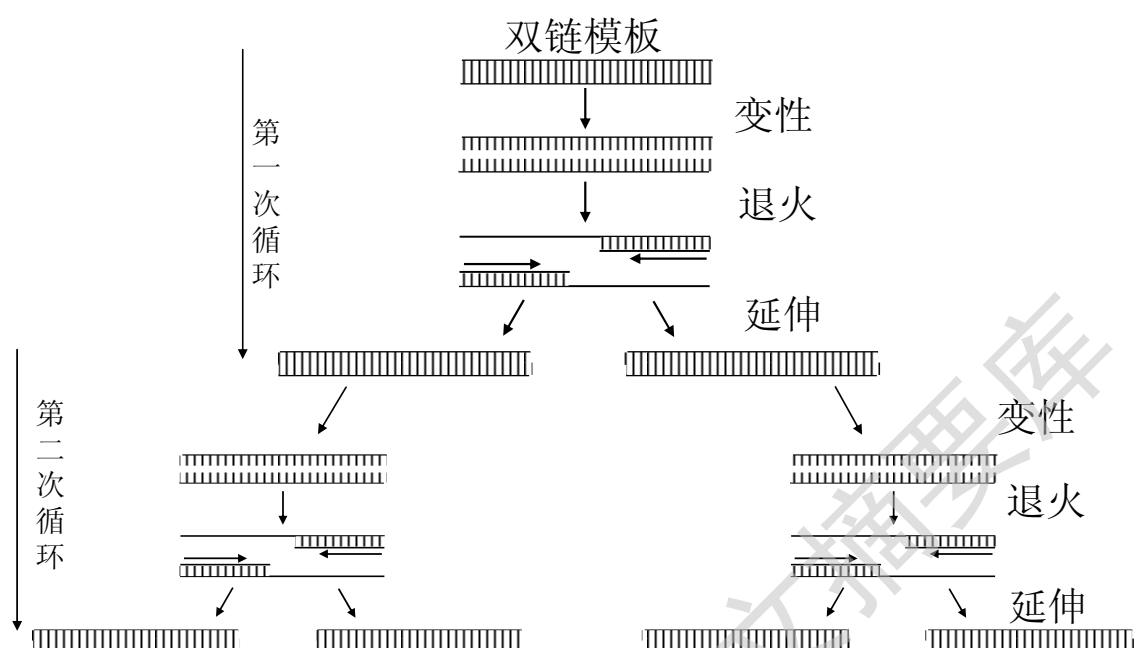


图 1-1 聚合酶链式反应（PCR）原理示意图^[6]

Figure 1-1 Principle of PCR

PCR以其巧妙的设计原理表现出如下特点^[6-8]：1）高特异性。PCR扩增严格遵守碱基配对原则的半保留复制，其新合成的子链与模板形成完全互补的结构，从而充分保证了复制的准确性。另外，由于碱基互补原则，只有当引物与目的基因完全互补时，反应体系中的引物才能与模板产生复性，引物的延伸才得以进行，因此引物与模板的互补是复制的最基本条件，这从另一方面决定了PCR反应的高特异性。2）高灵敏度。在PCR反应中，每一轮反应模板拷贝数都增加一倍，理论上n次循环后，扩增产物拷贝数为 2^{n-1} 。但在PCR反应后期由于底物的消耗、Taq酶活力的下降、PCR抑制物的增加，PCR反应的指数形式逐渐转化为线性形式进入扩增的平台期，实际上经过 30-35 个循环，扩增倍数仍然可达百万倍以上。3）简便快捷。Taq酶的使用和各种高效PCR仪的相继问世，使PCR操作可以在常规实验室中顺利完成。在实际应用中，许多技术得到改进，如扩增反应体积减少、多种成分预先混合，大大简化了加样步骤，一般在 1~2 小时完成扩增反应，满足了快速诊断等方面的要求。

1.1.1 PCR 技术存在的问题[6-8]

尽管PCR已发展成为一项相当成熟的技术，但在实际应用中，PCR技术尚存在一些需要改进的问题：1）污染问题。由于PCR具有高灵敏度，因此操作不当或其他污染

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库